

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-250681

(43)Date of publication of application : 03.10.1995

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

(21)Application number : 06-069961

(71)Applicant : TOMY SEIKO:KK

(22)Date of filing : 15.03.1994

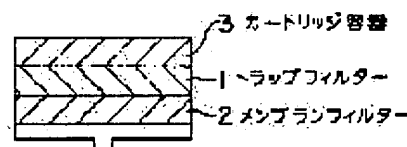
(72)Inventor : FUJISHIRO MASATOSHI

(54) METHOD FOR EXTRACTING AND PURIFYING DNA AND DEVICE THEREFOR

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a method for extracting and purifying DNA capable of inexpensively extracting and purifying a plasmid DNA replicated and amplified from a transformant from a culture solution of the whole night and to supply a device therefor.

CONSTITUTION: This extracting and purifying DNA comprises (1) a process for collecting microorganisms of a culture solution of a transformant in a first cartridge for extracting and purifying DNA, (2) a process for bacteriolysis and decomposing an unnecessary RNA, (3) a process for filtering impurities by the first cartridge for extracting and purifying DNA and (4) a process for adsorbing, cleaning and eluting the DNA by a second cartridge for extracting and purifying DNA. This device



for extracting and purifying DNA comprises the first cartridge for extracting and purifying DNA, composed of at least a trap filter and a membrane filter and the second cartridge for extracting and purifying DNA, composed of at least a glass filter and, a glass powder layer and a membrane filter.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

13.12.1995

[Date of sending the examiner's decision of

rejection]

[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3045922

[Date of registration] 17.03.2000

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right] 17.03.2005

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the DNA extract purification approach and equipment which carry out extract purification of the DNA for a short time from a multi-specimen sample.

[0002]

[Description of the Prior Art] Conventionally, it considers as the approach of carrying out extract purification of the plasmid DNA (extranuclear gene) from the transformant which carried out the transformation of the Escherichia coli etc., and the decoction method [BOILING METHOD (Holmes and D.S. and M.Quigley, 1981, Anal.Biochem.114:193)], the alkali bacteriolysis method [ALKALINE LYSIS METHOD (Birnboim and H.C. and J.Doly, 1979, Nucleic Acids Res.7:1513)], etc. are performed. However, these approaches were the approaches of using risk reagents, such as a phenol and chloroform, and time and effort requiring. Furthermore, there is the extract purification approach of the plasmid DNA by cesium chloride density gradient centrifugation as an approach of obtaining the purification sample of a high grade. Although the high grade purification of this approach is typical, operation takes long duration and a sample processing number is about ten at once. Moreover, although the device which automated the conventional approach was also developed, generally such a device is also expensive, or has a fault, like there are few processing measurement sizes, and had a problem practical.

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] A transformation method is the basic technique of genetic manipulation, and is indispensable to researches and developments of a life science or biotechnology. Therefore, to carry out extract purification of the extranuclear gene DNA by the short time and the high grade at the basis of high safety was desired from the transformant (what carried out the transformation of the Escherichia coli etc. especially) obtained by this approach.

[0004] Then, the purpose of this invention is to offer the DNA extract purification approach and equipment which can carry out extract purification of the extranuclear gene DNA (plasmid DNA) by which duplicate magnification was carried out by the transformant cheaply from culture medium all night.

[0005]

[Means for Solving the Problem] In order to attain the above-mentioned purpose, the summary of invention of claim 1 is (1). The process, and (2) which carry out the harvest of the transformant culture medium to the 1st cartridge for DNA extract purification A bacteriolysis and the decomposition process of unnecessary RNA, and (3) The impurity filtration process by the 1st cartridge for DNA extract purification, and (4) It is in the extract purification approach of plasmid DNA including the process which adsorbs DNA, washes and is eluted in the 2nd cartridge for DNA extract purification.

[0006] in order to attain the above-mentioned purpose, the summary of invention of claim 2 is in the DNA extract refiner containing the 1st cartridge for DNA extract purification which contains the filter for transformant uptake-cum-bacteriolyses (it is called a trap filter by this detail letter), and a

membrane filter at least, and the 2nd cartridge for DNA extract purification which contains a glass fiber filter, a glass powder layer, and a membrane filter at least.

[0007] As for the extract purification approach of DNA concerning this invention, it is desirable to include the following processes in more detail.

[0008] (1) ** which carries out the harvest of the transformant culture medium to the 1st cartridge prepares the all night culture medium of a transformant in advance of this process. Although the transformant which carried out the transformation of this here as a transformant set as the object of application of this invention by making *Escherichia coli* (for example, [*Escherichia coli* JM 101 (ATCC 33876), *Escherichia coli* HB one 101 (ATCC 33694), *Escherichia coli* JM], etc. 109 (ATCC 53323)) into a host microorganism is typical, it can use also for extract purification of the extranuclear gene DNA from the transformant which, in addition to this, made the host the microorganism in which an alkali bacteriolysis is possible. This transformation can be performed according to a well-known conventional method (for example, Hanahan, D., 1983, *J.Mol.Biol.*, 166, 577) for this contractor. The above-mentioned all night culture medium is cultivated by the usually suitable selective medium all night for several hours. In the case of the transformant of *Escherichia coli*, as a selective medium, it is ampicillin (ampisilin) because of the drug resistance gene in a plasmid. LB containing the antibiotic made into representation (Luria Bertani) Although a culture medium is desirable, in addition unless it can use a NZCYM culture medium, a SOC culture medium, etc. and achievement of the purpose of this invention is checked, it is not limited to these and other well-known culture media can be used for this contractor. That is, the nature or the artificial culture medium containing a nitrogen source, a carbon source, phosphate, magnesium salt, a minor constituent, etc. can be used.

[0009] At this process, culture medium is poured distributively to the 1st cartridge for DNA extract purification prepared all night.

[0010] Thus, the reduced pressure actuation or centrifugal separation actuation by the vacuum pump is performed to the 1st cartridge for DNA extract purification which poured culture medium distributively all night, and the harvest of the transformant is carried out to it on the 1st cartridge for DNA extract purification. That is, uptake is carried out to the framework structure of the trap filter of the 1st cartridge for DNA extract purification, and the harvest of the transformant is carried out.

[0011] (2) At this process, ***** of a bacteriolysis and unnecessary RNA adds the reagent for bacteriolyses on the trap filter of the 1st cartridge for DNA extract purification, carries out the bacteriolysis of the transformant, and carries out elution of the extranuclear gene (plasmid DNA) out of a cell. Moreover, at this process, unnecessary RNA is digested with the reagent for bacteriolyses to coincidence. Therefore, as for the above-mentioned reagent for bacteriolyses, it is desirable that the ribonuclease (RNase) for digesting the lytic enzyme and RNA for performing a bacteriolysis is included. As lytic enzyme, the lysozyme (lysozyme) which is bacterial cell wall hydrolase can be used, for example, and ribonuclease A (RNaseA) can be used as a ribonuclease, for example. Only a kind may be independently used for these and can also be used for them combining two or more sorts of things. The extranuclear gene (plasmid DNA) which carries out elution is used as a vector as everyone knows, and, naturally Cosmid DNA is contained in plasmid DNA here. After this process adds the reagent for bacteriolyses in the trap filter of the 1st cartridge for DNA extract purification, at a room temperature, it is left for 5 to 10 minutes, and is performed.

[0012] (3) The impurity filtration process above by the 1st cartridge for DNA extract purification (2) After finishing a process, full solubilization processing of a sample is performed by carrying out optimum dose addition of the sodium-lauryl-sulfate solution 0.2-N sodium hydroxide, reagent [the reagent for full solubilization processing of a sample], and [for example,], 1%, and leaving it for 2 - 5 minutes at a room temperature on the trap filter of the 1st cartridge for DNA extract purification. Subsequently, while carrying out optimum dose addition of the 3M potassium acetate (pH4.8), leaving it for 3 - 5 minutes at a room temperature for example, and neutralizing a basic solution, coagulation processing of cell configuration protein and the chromosome DNA is carried out. And filtration actuation using reduced pressure by the vacuum pump or filtration actuation by centrifugal separation is performed to the 1st cartridge for DNA extract purification (what carried out the harvest at the

beginning), and the extract containing plasmid DNA is separated (extracted from the lower part of the 1st cartridge for DNA extract purification).

[0013] (4) ** which adsorbs DNA, washes and is eluted in the 2nd cartridge for DNA extract purification adds to the 2nd cartridge for DNA extract purification first at this process, Reagent NaI, for example, 8M sodium iodide, for the extract obtained at the process of the above (3), and equivalent DNA adsorption. This is based on the DNA adsorption to glass powder being promoted under chaotropic ion (chaotropic ion) existence. The DNA adsorption process to glass powder is applied also to the approach of carrying out extract purification of the DNA fragment furthermore separated by agarose gel electrophoresis from agarose gel (Vogelstein, B. and D.Gillespie, 1979, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76:615). as the reagent which generates chaotropic ion -- LiClO₄, KI, NaI, LiCl, and NaCHO₂ etc. -- although it is, acquisition of NaI (sodium iodide) is easy. Subsequently, actuation using reduced pressure by the vacuum pump or actuation by centrifugal separation is performed to this 2nd cartridge for DNA extract purification, and plasmid DNA is made to stick to it. This cartridge is at least four-fold structure which consists of a glass fiber filter (bilayer), a glass powder layer, and a membrane filter, as mentioned later. Plasmid DNA is mainly adsorbed by the glass powder layer. Furthermore, it is the buffer solution for washing, for example, a 10mM tris-hydrochloric acid (pH8.0) and 1mM, to this 2nd cartridge for DNA extract purification. Ethanol is added EDTA, 0.2MNaCl, and 50%, and it washes by performing actuation using reduced pressure by the vacuum pump, or actuation by centrifugal separation. In the last, it is the buffer solution for elution, for example, sterile distilled water / 10mM tris-hydrochloric acid (pH8.0), and 1mM, to this 2nd cartridge for DNA extract purification. 50-100microl addition of EDTA is done, actuation using reduced pressure by the vacuum pump or actuation by centrifugal separation is performed, and elution purification only of the plasmid DNA is carried out.

[0014]

[Example] The example of a trial of the DNA extract approach concerning this invention which explained below, referring to the example which showed the DNA extractor concerning this invention to the accompanying drawing, then was performed below using this DNA extractor is explained. However, all of modification of the technical thought of this invention instead of the thing of intention that these examples or the example of a trial limits the technical range of this invention within the limits, addition, and qualification are contained in the technical range of this invention.

[0015] Drawing 1 shows the example of the 1st cartridge for DNA extract purification among the DNA extractors concerning this invention, and, as for a trap filter and 2, 1 is [a membrane filter and 3] cartridge containers in drawing.

[0016] The trap filter 1 is the layer of a carrying-out [fungus bodies / carry out uptake of the fungus bodies, such as Escherichia coli which is mainly a transformant, and]-bacteriolysis sake. As the quality of the material, a glass fiber filter, a polyethylene resin filter, a nonwoven fabric filter, etc. are desirable, and it is desirable to have the property which carries out uptake of the fungus bodies, such as Escherichia coli, in three dimensions. Specifically, the glass fiber filter by Toyo Roshi Kaisha, Ltd., the polyethylene resin filter by Spacey Chemical, etc. can be used.

[0017] A membrane filter 2 is mainly a layer for filtration and removal of discard, such as coagulation protein and Chromosome DNA. As the quality of the material, cellulose acetate, polyvinylidene fluoride, etc. are desirable and it is desirable to have the biological inactive and low protein adsorbent property. Specifically, the cellulose acetate type membrane filter by Toyo Roshi Kaisha, Ltd., the DEYURA pore membrane by Millipore Corp., etc. can be used.

[0018] The cartridge container 3 is constituted from an outer container and a container liner for filter immobilization, a body part can make it usually cylindrical and phi10-20mm and a thing with a die length of 30-50mm can usually be used for it as magnitude.

[0019] In addition, in the example of drawing 1 , although only the trap filter 1, the membrane filter 2, and the cartridge container 3 are displayed typically, a micro tube can also be prepared in others if needed. Moreover, in case such a cartridge is used, it is used for application of this invention with a required peripheral device, for example, a centrifuge, or a vacuum pump, and the cartridge stand for

suction.

[0020] Drawing 2 shows the example of the 2nd cartridge for DNA extract purification among the DNA extractors concerning this invention, and, for a glass fiber filter and 22, as for a glass fiber filter and 24, a glass powder layer and 23 are [21 / a membrane filter and 25] cartridge containers in drawing.

[0021] The glass fiber filters 21 and 23 are mainly the layers for plasmid adsorption assistance. As the quality of the material, a detailed borosilicate glass fiber etc. is desirable and it is desirable to have the inactive property to a biochemical liquid. concrete -- GA- by Toyo Roshi Kaisha, Ltd. -- GF series by 100, 200, GC-50, and Watt Mann etc. can be used.

[0022] The glass powder layer 22 is mainly a layer for DNA adsorption. As the quality of the material, a silica matrix etc. is desirable and it is desirable to have the property of 0.25 or less cm/min of underwater settling velocity. Specifically, the glass powder by Asahi Glass Co., Ltd., GLASSMILKTM by BIO101 company, etc. can be used.

[0023] A function, the quality of the material, etc. of a membrane filter 24 and the cartridge container 25 are the same as that of the above-mentioned membrane filter 2 of drawing 1 , and the cartridge container 3.

[0024] The 2nd cartridge production for DNA extract purification adds 20-100micro of glass powder suspension 1, after carrying out the laminating of a membrane filter and the glass fiber filter to order. Centrifugal [of this cartridge] is carried out by reduced pressure suction or the swing rotor, homogeneity is made to stick glass powder on a glass fiber filter, the laminating of the glass fiber filter is carried out further, and four-fold layer structure cartridge is produced.

[0025] In addition, in the example of drawing 2 , although only the glass fiber filter 21, the glass powder layer 22, the glass fiber filter 23, the membrane filter 24, and the cartridge container 25 are displayed typically, otherwise, the micro tube which receives a purification DNA eluate can also be prepared in the bottom of a cartridge filter if needed. Moreover, in case such a cartridge is used, it is used for application of this invention with a required peripheral device, for example, a centrifuge, or a vacuum pump, and the cartridge stand for suction.

[0026] The material which constitutes each layer of the above 1st and the 2nd cartridge for DNA extract purification can come to hand cheaply in these the very thing commercial scene. Therefore, the cost-burden on manufacture is small in offer of the equipment concerning this invention.

[0027] Next, the example of a trial of the DNA extract purification approach concerning this invention performed using the 1st and 2nd cartridge for DNA extract purification shown in above-mentioned drawing 1 and drawing 2 is shown.

[0028] Example of a trial (1) ** which carries out the harvest of the transformant culture medium to the 1st cartridge prepared the all night culture medium of a transformant in advance of this process. Escherichia coli [E. The transformant which carried out the transformation of this by making Coli HB101 (ATCC 33694) into a host microorganism according to the approach (Hanahan, D., 1983, J.Mol.Biol., 166, 577) of Hanahan was used. As a selective medium, it is ampicillin (ampisilin). Included Luria BERUTANI (LuriaBertani) The culture medium was used. The presentation of this culture medium was as follows.

Bacto-tryptone : 10 g/L Bacto-yeast extract : 5 g/L NaCl : 10 g/L Ampicilin : 35 - 50 mg/L sodium hydroxide adjusted pH to 7.5. 3ml of this culture medium was used, and it cultivated all night. In addition, when using the drawing 1 , 1st [of drawing 2], and 2nd cartridge for DNA extract purification, it is suitable for the capacity of a culture medium to be referred to as one to 3 ml. Culture medium was poured distributively to the 1st cartridge for DNA extract purification prepared all night. Thus, centrifugal separation actuation was performed to the 1st cartridge for DNA extract purification which poured culture medium distributively all night, and the collection of the transformant was carried out to the trap filter of the 1st cartridge for DNA extract purification.

[0029] (2) The reagent for bacteriolyses of a bacteriolysis and 200micro of decomposition processes 1 of unnecessary RNA was added in the trap filter of the cartridge for DNA extract purification of the above 1st, the bacteriolysis of the transformant was carried out, and elution of the extranuclear gene (plasmid DNA) was carried out out of the cell. Moreover, unnecessary RNA was digested with the

reagent for bacteriolyses to coincidence at this process. as lytic enzyme, ** containing ribonuclease A was used for the above-mentioned reagent for bacteriolyses as an ribonuclease including the lysozyme (lysozyme). After this process added the reagent for bacteriolyses in the trap filter of the 1st cartridge for DNA extract purification, at the room temperature, it was left for 10 minutes and performed.

[0030] (3) The impurity filtration process above by the 1st cartridge for DNA extract purification (2) After finishing a process, full solubilization processing of a sample was performed by doing 400microl addition of a sodium-lauryl-sulfate solution 0.2-N sodium hydroxide and 1% as a reagent for full solubilization processing of a sample, and leaving it for 5 minutes at a room temperature in the trap filter of the 1st cartridge for DNA extract purification. Subsequently, 300microl addition of 3M potassium acetate (pH4.8) was done, and while leaving it for 5 minutes at the room temperature and neutralizing the basic solution, coagulation processing of cell configuration protein and the chromosome DNA was carried out. And filtration actuation by centrifugal separation was performed to the 1st cartridge for DNA extract purification (what carried out the harvest at the beginning), and the extract containing plasmid DNA was separated (it extracted from the lower part of the 1st cartridge for DNA extract purification).

[0031] (4) ** which adsorbs DNA, washes and is eluted in the 2nd cartridge for DNA extract purification is the above (3) first at this process. The 8M sodium iodide NaI was added to the 2nd cartridge for DNA extract purification as a reagent for the extract obtained at the process, and equivalent DNA adsorption. Subsequently, actuation by centrifugal separation was performed to this 2nd cartridge for DNA extract purification, and the glass fiber filter and glass powder of this cartridge were made it to adsorb plasmid DNA. . Furthermore, they are a 10mM tris-hydrochloric acid (pH8.0) and 1mM as the buffer solution for washing to this 2nd cartridge for DNA extract purification. 350microl addition of ethanol was done EDTA, 0.2MNaCl, and 50%, and it washed by performing actuation by centrifugal separation. In the last, they are distilled water / 10mM tris-hydrochloric acid (pH8.0), and 1mM as the buffer solution for elution to this 2nd cartridge for DNA extract purification. 100microl addition of EDTA was done, actuation by centrifugal separation was performed and elution purification only of the plasmid DNA was carried out.

[0032] The result of agarose-gel-electrophoresis separation of the plasmid DNA refined in the above-mentioned example of a trial by drawing 3 is shown. RNA which is impurity, the chromosome origin DNA, and proteinic mixing were not seen at all, but the purity more than cesium chloride density gradient ultra-centrifugal separation purification plasmid DNA and an EQC was obtained. Therefore, the thing usable convenient was checked by various analysis experiments.

[0033]

[Effect of the Invention] As mentioned above, according to this invention, the DNA extract purification approach and equipment which can carry out extract purification of the extranuclear gene DNA (plasmid DNA) by which duplicate magnification was carried out by the transformant cheaply from culture medium all night are offered so that clearly.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] (1) The process and (2) which carry out the harvest of the transformant culture medium to the 1st cartridge for DNA extract purification A bacteriolysis and the decomposition process of unnecessary RNA, and (3) The impurity filtration process by the 1st cartridge for DNA extract purification, and (4) The extract purification approach of plasmid DNA including the process which adsorbs DNA, washes and is eluted in the 2nd cartridge for DNA extract purification.

[Claim 2] The DNA extract refiner containing the 1st cartridge for DNA extract purification which contains a trap filter and a membrane filter at least, and the 2nd cartridge for DNA extract purification which contains a glass fiber filter, a glass powder layer, and a membrane filter at least.

[Claim 3] The 1st cartridge for DNA extract purification of claim 2 directly used for operation of the DNA extract refiner of claim 2.

[Claim 4] The 2nd cartridge for DNA extract purification of claim 2 directly used for operation of the DNA extract refiner of claim 2.

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-250681

(43)公開日 平成7年(1995)10月3日

(51)Int.Cl. ⁴	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09		9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数4 F D (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平6-69961

(22)出願日 平成6年(1994)3月15日

(71)出願人 000134486

株式会社トミー精工

東京都練馬区旭町2丁目2番12号

(72)発明者 藤城 正俊

東京都練馬区旭町2丁目2番12号 株式会

社トミー精工内

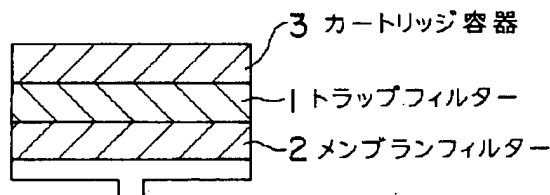
(74)代理人 弁理士 奥山 尚男 (外4名)

(54)【発明の名称】 DNA抽出精製方法及び装置

(57)【要約】

【目的】 形質転換体で複製増幅された核外遺伝子DNA(プラスミドDNA)を、終夜培養液から安価に抽出精製することのできるDNA抽出精製方法及び装置を提供する。

【構成】 (1) 形質転換体培養液を第1のDNA抽出精製用カートリッジに集菌する工程、(2) 溶菌及び不要RNAの分解工程、(3) 第1のDNA抽出精製用カートリッジによる不純物濾過工程、(4) 第2のDNA抽出精製用カートリッジでDNAを吸着、洗浄、溶出する工程を含むプラスミドDNAの抽出精製方法、及び少なくともトラップフィルター及びメンブランフィルターを含む第1のDNA抽出精製用カートリッジと、少なくともガラス繊維フィルターとガラスパウダー層とメンブランフィルターとを含む第2のDNA抽出精製用カートリッジとを含むDNA抽出精製装置。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 (1) 形質転換体培養液を第1のDNA抽出精製用カートリッジに集菌する工程、(2) 溶菌及び不要RNAの分解工程、(3) 第1のDNA抽出精製用カートリッジによる不純物濾過工程、(4) 第2のDNA抽出精製用カートリッジでDNAを吸着、洗浄、溶出する工程を含むプラスミドDNAの抽出精製方法。

【請求項2】 少なくともトラップフィルター及びメンブランフィルターを含む第1のDNA抽出精製用カートリッジと、少なくともガラス繊維フィルターとガラスパウダー層とメンブランフィルターとを含む第2のDNA抽出精製用カートリッジとを含むDNA抽出精製装置。

【請求項3】 請求項2のDNA抽出精製装置の実施に直接使用する請求項2の第1のDNA抽出精製用カートリッジ。

【請求項4】 請求項2のDNA抽出精製装置の実施に直接使用する請求項2の第2のDNA抽出精製用カートリッジ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、多検体試料からDNAを短時間に抽出精製するDNA抽出精製方法及び装置に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、大腸菌等を形質転換した形質転換体からプラスミドDNA（核外遺伝子）を抽出精製する方法として、煮沸法〔BOILING METHOD（Holmes, D. S. 及びM. Quigley, 1981, Anal. Biochem. 114:193）〕やアルカリ溶菌法〔ALKALINE LYSIS METHOD（Birnboim, H. C. 及びJ. Doly, 1979, Nucleic Acids Res. 7:151 3）〕等が行われている。しかし、これらの方法は、フェノール、クロロホルム等の危険試薬を使用し、手間のかかる方法であった。さらに、高純度の精製試料を得る方法として、塩化セシウム密度勾配遠心分離法によるプラスミドDNAの抽出精製方法がある。この方法は、高純度精製の代表的なものであるが、実施に長時間を要し、試料処理本数は、一度に10本程度である。また、従来の方法を自動化した機器も開発されているが、このような機器も一般的に高価であったり、処理サンプル数が少ない等の欠点を有しており、実用的には問題があった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】形質転換法は、遺伝子操作の基本技術であり、ライフサイエンスあるいはバイオテクノロジーの研究開発にとって不可欠である。したがって、この方法によって得られた形質転換体（特に、大腸菌等を形質転換したもの）から核外遺伝子DNAを、高い安全性のもとに、短時間かつ高純度で抽出精製することが望まれていた。

【0004】そこで、本発明の目的は、形質転換体で複

製増幅された核外遺伝子DNA（プラスミドDNA）を、終夜培養液から安価に抽出精製することのできるDNA抽出精製方法及び装置を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するため、請求項1の発明の要旨は、(1) 形質転換体培養液を第1のDNA抽出精製用カートリッジに集菌する工程、(2) 溶菌及び不要RNAの分解工程、(3) 第1のDNA抽出精製用カートリッジによる不純物濾過工程、(4) 第2のDNA抽出精製用カートリッジでDNAを吸着、洗浄、溶出する工程を含むプラスミドDNAの抽出精製方法にある。

【0006】上記目的を達成するため、請求項2の発明の要旨は、少なくとも形質転換体捕集兼溶菌用フィルター（本明細書中では、トラップフィルターという）及びメンブランフィルターを含む第1のDNA抽出精製用カートリッジと、少なくともガラス繊維フィルターとガラスパウダー層とメンブランフィルターとを含む第2のDNA抽出精製用カートリッジとを含むDNA抽出精製装置にある。

【0007】本発明にかかるDNAの抽出精製方法は、より詳しくは、以下の工程を含むことが好ましい。

【0008】(1) 形質転換体培養液を第1のカートリッジに集菌する工程

この工程に先だって、形質転換体の終夜培養液を調製する。ここで、本発明の適用の対象となる形質転換体としては、大腸菌〔例えば、大腸菌JM101 (ATCC 33876)、大腸菌HB101 (ATCC 33694)、大腸菌JM109 (ATCC 53323)等〕を宿主微生物として、これを形質転換した形質転換体が代表的なものであるがこの他にアルカリ溶菌が可能な微生物を宿主とした形質転換体からの核外遺伝子DNAの抽出精製にも用いることができる。この形質転換は、当業者にとって公知の常法（例えば、Hanahan, D., 1983, J. Mol. Biol., 166, 577）に従って行うことができる。上記終夜培養液は、通常適当な選択培地に数時間終夜培養される。選択培地としては、大腸菌の形質転換体の場合、プラスミド内の薬剤耐性遺伝子のため、アンピシリン(ampisilin)を代表とする抗生物質を含むLB (Luria Bertani) 培地が好ましいが、この他にも、NZCYM培地、SOC培地等を用いることができ、本発明の目的の達成を阻害しない限り、これらに限定されるものではなく、当業者にとって公知の他の培地を用いることができる。すなわち、窒素源、炭素源、リン酸塩、マグネシウム塩、微量成分等を含む天然もしくは人工培地を使用することができる。

【0009】本工程では、調製された終夜培養液を、第1のDNA抽出精製用カートリッジに分注する。

【0010】このように、終夜培養液を分注した第1のDNA抽出精製用カートリッジに真空ポンプによる減圧操作あるいは遠心分離操作を施し、形質転換体を第1の

DNA抽出精製用カートリッジ上に集菌する。すなわち、第1のDNA抽出精製用カートリッジのトラップフィルターの立体網目構造に捕集され、形質転換体が集菌される。

【0011】(2) 溶菌及び不要RNAの分解工程

この工程では、溶菌用試薬を第1のDNA抽出精製用カートリッジのトラップフィルター上に添加し、形質転換体を溶菌させ、核外遺伝子(プラスミドDNA)を細胞外に溶出させる。また、この工程では、同時に溶菌用試薬によって不要なRNAを消化する。したがって、上記溶菌用試薬は、溶菌を行うための溶菌酵素とRNAを消化するためのRNA分解酵素(リボヌクレアーゼ)を含むことが好ましい。溶菌酵素としては、例えば、細菌細胞壁加水分解酵素であるリゾチーム(lysozyme)を用いることができ、RNA分解酵素としては、例えば、リボヌクレアーゼA(RNaseA)を使用することができる。これらは、一種のみを単独で用いても良く、また二種以上のものを組み合わせて用いることもできる。溶出させる核外遺伝子(プラスミドDNA)は、周知のとおりベクターとして利用されるものであり、ここでいうプラスミドDNAには、コスミドDNAも当然含まれる。この工程は、溶菌用試薬を第1のDNA抽出精製用カートリッジのトラップフィルターに添加した後、室温にて5-10分間放置して行われる。

【0012】(3) 第1のDNA抽出精製用カートリッジによる不純物過工程

上記(2)の工程を終えた後、第1のDNA抽出精製用カートリッジのトラップフィルター上に、試料の完全可溶化処理のための試薬、例えば、0.2N水酸化ナトリウム・1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液を適量添加し、室温にて2-5分間放置することにより、試料の完全可溶化処理を行う。次いで、例えば、3M酢酸カリウム(pH4.8)を適量添加して、室温にて3-5分間放置し、塩基性溶液を中和するとともに、細胞構成タンパク質及び染色体DNAを凝固処理する。そして、第1のDNA抽出精製用カートリッジ(当初集菌したもの)に真空ポンプによる減圧を用いた過工程あるいは遠心分離による過工程を施し、プラスミドDNAを含む抽出液を分離する(第1のDNA抽出精製用カートリッジの下部より抽出される)。

【0013】(4) 第2のDNA抽出精製用カートリッジでDNAを吸着、洗浄、溶出する工程

この工程では、まず、上記(3)の工程で得られた抽出液及び等量のDNA吸着のための試薬、例えば、8Mヨウ化ナトリウムNaIを第2のDNA抽出精製用カートリッジに添加する。これは、ガラスパウダーへのDNA吸着はカオトロピックイオン(chotropic ion)存在下で促進されることに基づいている。さらにアガロースゲル電気泳動で分離したDNA断片をアガロースゲルから抽出精製する方法にもガラスパウダーへのDNA吸着法が

応用されている(Vogelstein, B.及びD. Gillespie, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:615)。カオトロピックイオンを生成する試薬として、 LiClO_4 、 KI 、 NaI 、 LiCl 、 NaCHO_2 等があるが、 NaI (ヨウ化ナトリウム)の入手が容易である。次いで、この第2のDNA抽出精製用カートリッジに、真空ポンプによる減圧を用いた操作あるいは遠心分離による操作を施し、プラスミドDNAを、吸着させる。このカートリッジは、後述するように、ガラス繊維フィルター(二層)とガラスパウダー層とメンブランフィルターとから成る少なくとも四重の構造である。プラスミドDNAは、主として、ガラスパウダー層に吸着される。さらに、この第2のDNA抽出精製用カートリッジに洗浄用緩衝液、例えば、10mMトリス塩酸(pH8.0)・1mM EDTA・0.2M NaCl・50%エタノールを添加し、真空ポンプによる減圧を用いた操作あるいは遠心分離による操作を施し、洗浄を行う。最後に、この第2のDNA抽出精製用カートリッジに、溶出用緩衝液例えば、滅菌蒸留水/10mMトリス塩酸(pH8.0)・1mM EDTAを50-100 μ l添加して、真空ポンプによる減圧を用いた操作あるいは遠心分離による操作を施し、プラスミドDNAのみを溶出精製する。

【0014】

【実施例】以下に、本発明にかかるDNA抽出装置を添付図面に示した実施例を参照しながら説明し、続いて、このDNA抽出装置を用いて行った本発明にかかるDNA抽出方法の試験例を説明する。しかし、これらの実施例あるいは試験例は、本発明の技術的範囲を限定する意図のものではなく、本発明の技術的思想の範囲内における、変更、付加、修飾は全て本発明の技術的範囲に含まれる。

【0015】図1は、本発明にかかるDNA抽出装置のうち、第1のDNA抽出精製用カートリッジの実施例を示し、図において、1はトラップフィルター、2はメンブランフィルター、3はカートリッジ容器である。

【0016】トラップフィルター1は、主として形質転換体である大腸菌等の菌体を捕集し、溶菌するための層である。材質としては、ガラス繊維フィルターやポリエチレン樹脂フィルターや不織布フィルター等が好ましく、大腸菌等の菌体を立体的に捕集する特性を備えていることが好ましい。具体的には、東洋濾紙社製のガラス繊維フィルター、スベイスケミカル社製のポリエチレン樹脂フィルター等を使用することができる。

【0017】メンブランフィルター2は、主として凝固タンパク、染色体DNA等の不要物の過工程・除去のための層である。材質としては、酢酸セルロース、ポリフッ化ビニリデン等が好ましく、生物学的不活性、低タンパク吸着性の特性を備えていることが好ましい。具体的には、東洋濾紙社製のセルロースアセテートタイプメン

5

ランフィルター、ミリポア社製のデュラポアメンブラン等を使用することができる。

【0018】カートリッジ容器3は、通常、外容器及びフィルター固定用内筒で構成し、本体部分は、通常、円柱状とし、大きさとしては、 $\phi 10 \sim 20 \text{ mm}$ 、長さ30～50mmのものを使用することができる。

【0019】なお、図1の実施例では、トラップフィルター1、メンブランフィルター2、カートリッジ容器3のみを模式的に表示しているが、必要に応じて他にマイクロチューブを設けることもできる。また、このようなカートリッジを使用する際に、必要な周辺機器、例えば、遠心機もしくは真空ポンプ及び吸引用カートリッジスタンドを、本発明の適用に伴って使用する。

【0020】図2は、本発明にかかるDNA抽出装置のうち、第2のDNA抽出精製用カートリッジの実施例を示し、図において、21はガラス繊維フィルター、22はガラスパウダー層、23はガラス繊維フィルター、24はメンブランフィルター、25はカートリッジ容器である。

【0021】ガラス繊維フィルター21、23は、主としてプラスミド吸着補助のための層である。材質としては、微細ホウケイ酸塩ガラス繊維等が好ましく、生化学的液体に対して不活性の特性を備えていることが好ましい。具体的には、東洋濾紙社製のGA-100、200、GC-50、ワットマン社製のGFシリーズ等を使用することができる。

【0022】ガラスパウダー層22は、主としてDNA吸着のための層である。材質としては、シリカマトリックス等が好ましく、水中沈降速度0.25cm/min以下の特性を備えていることが好ましい。具体的には、旭硝子社製のガラスパウダー、BIO101社製のGLASSMILK™等を使用することができる。

【0023】メンブランフィルター24、カートリッジ容器25の機能及び材質等は、上記した図1のメンブランフィルター2、カートリッジ容器3と同様である。

【0024】第2のDNA抽出精製用カートリッジ作製はメンブランフィルター、ガラス繊維フィルターを順に積層した後、ガラスパウダー懸濁液20～100 μl を添加する。このカートリッジを減圧吸引ないしはスイングロータで遠心してガラスパウダーをガラス繊維フィルター上に均一に密着させ、さらにガラス繊維フィルターを積層して四重の層構造カートリッジを作製する。

【0025】なお、図2の実施例では、ガラス繊維フィルター21、ガラスパウダー層22、ガラス繊維フィルター23、メンブランフィルター24、カートリッジ容器25のみを模式的に表示しているが、必要に応じて他にカートリッジフィルターの下に精製DNA溶出液を受けるマイクロチューブを設けることもできる。また、このようなカートリッジを使用する際に、必要な周辺機器、例えば、遠心機もしくは真空ポンプ及び吸引用カー

6

トリッジスタンドを、本発明の適用に伴って使用する。

【0026】上記第1、第2のDNA抽出精製用カートリッジの各々の層を構成する素材は、それら自体市場において安価に入手できるものである。したがって、本発明にかかる装置の提供にあたり製造上のコスト的負担は小さい。

【0027】次に、上記図1、図2に示した第1、第2のDNA抽出精製用カートリッジを用いて行った本発明にかかるDNA抽出精製方法の試験例を示す。

【0028】試験例

(1) 形質転換体培養液を第1のカートリッジに集菌する工程

この工程に先だって、形質転換体の終夜培養液を調製した。大腸菌[E. Coli HB101 (ATCC 33694)]を宿主微生物として、これをHanahanの方法(Hanahan, D., 1983, J. Mol. Biol., 166, 577)に従い形質転換した形質転換体を使用した。選択培地としては、アンピシリン(ampicillin)を含むルリア・ベルタニ(Luria-Bertani)培地を使用した。この培地の組成は、以下のとおりであった。

Bacto-trytone	: 10 g/L
Bacto-yeast extract	: 5 g/L
NaCl	: 10 g/L
Ampicillin	: 35～50 mg/L

水酸化ナトリウムによってpHを7.5に調整した。この培地3mlを使用して、終夜培養を行った。なお、培地の容量は、図1、図2の第1、第2のDNA抽出精製用カートリッジを用いる場合、1～3mlとすることが好適である。調製された終夜培養液を、第1のDNA抽出精製用カートリッジに分注した。このように、終夜培養液を分注した第1のDNA抽出精製用カートリッジに遠心分離操作を施し、形質転換体を第1のDNA抽出精製用カートリッジのトラップフィルターに捕集した。

【0029】(2) 溶菌及び不要RNAの分解工程

200 μl の溶菌用試薬を上記第1のDNA抽出精製用カートリッジのトラップフィルターに添加し、形質転換体を溶菌させ、核外遺伝子(プラスミドDNA)を細胞外に溶出させた。また、この工程で、同時に溶菌用試薬によって不要なRNAを消化した。上記溶菌用試薬は、溶菌酵素としては、リゾチーム(lysozyme)を含み、RNA分解酵素として、リボヌクレアーゼAを含むものをを使用した。本工程は、溶菌用試薬を第1のDNA抽出精製用カートリッジのトラップフィルターに添加した後、室温にて10分間放置して行った。

【0030】(3) 第1のDNA抽出精製用カートリッジによる不純物過工程

上記(2)の工程を終えた後、第1のDNA抽出精製用カートリッジのトラップフィルターに、試料の完全可溶化処理のための試薬として0.2N水酸化ナトリウム・1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液を400 μl 添加し、室

温にて5分間放置することにより、試料の完全可溶化処理を行った。次いで、3M酢酸カリウム(pH4.8)を300 μ l添加して、室温にて5分間放置し、塩基性溶液を中和するとともに、細胞構成タンパク質及び染色体DNAを凝固処理した。そして、第1のDNA抽出精製用カートリッジ(当初集菌したもの)に遠心分離による過操作を施し、プラスミドDNAを含む抽出液を分離した(第1のDNA抽出精製用カートリッジの下部より抽出した)。

【0031】(4) 第2のDNA抽出精製用カートリッジ 10
でDNAを吸着、洗浄、溶出する工程

この工程では、まず、上記(3)の工程で得られた抽出液及び等量のDNA吸着のための試薬として8Mヨウ化ナトリウムNaIを第2のDNA抽出精製用カートリッジに添加した。次いで、この第2のDNA抽出精製用カートリッジに、遠心分離による操作を施し、プラスミドDNAを、このカートリッジのガラス繊維フィルター及びガラスパウダーに吸着させた。。さらに、この第2のDNA抽出精製用カートリッジに洗浄用緩衝液として、10mMトリス塩酸(pH8.0)・1mM EDTA 20
・0.2MNaCl・50%エタノールを350 μ l添加し、遠心分離による操作を施し、洗浄を行った。最後に、この第2のDNA抽出精製用カートリッジに、溶出用緩衝液として、蒸留水/10mMトリス塩酸(pH8.0)・1mM EDTAを100 μ l添加して、遠心分離による操作を施し、プラスミドDNAのみを溶出精製した。

【0032】図3に、上記試験例で精製されたプラスミ

ドDNAのアガロースゲル電気泳動分離の結果を示す。夾雑物であるRNA、染色体由来DNA、タンパク質の混入は全く見られず、塩化セシウム密度勾配超遠心分離精製プラスミドDNAと同等以上の純度が得られた。したがって、各種解析実験に支障なく使用可能であることが確認された。

【0033】

【発明の効果】以上より明らかなように、本発明によれば、形質転換体で複製増幅された核外遺伝子DNA(プラスミドDNA)を、終夜培養液から安価に抽出精製することのできるDNA抽出精製方法及び装置が提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】第1のDNA抽出精製用カートリッジの構造を示す模式図である。

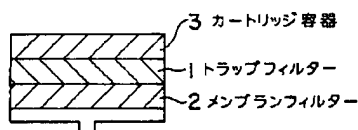
【図2】第2のDNA抽出精製用カートリッジの構造を示す模式図である。

【図3】試験例の電気泳動の結果を示すグラフである。

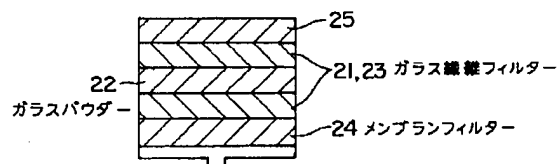
【符合の説明】

- 1 トラップフィルター
- 2 メンブランフィルター
- 3 カートリッジ容器
- 21 ガラス繊維フィルター
- 22 ガラスパウダー層
- 23 ガラス繊維フィルター
- 24 メンブランフィルター
- 25 カートリッジ容器

【図1】



【図2】



【図3】

アガロースゲル電気泳動分離結果

A B C



レーン A : 分子量マーカー
B : 塩化セシウム密度勾配
遠心分離精製プラスミド
C : 本法精製プラスミド